

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 560 046

(21) N° d'enregistrement national :

85 02617

(51) Int Cl⁴ : A 61 K 35/74; A 23 C 9/12, 11/00; C 12 N
1/20 // (C 12 N 1/20, C 12 R 1:01).

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 22 février 1985.

(71) Demandeur(s) : SCHULER Rudolf et SCHULER Angelo.
— DE.

(30) Priorité : DE, 24 février 1984, n° P 34 06 772.8.

(72) Inventeur(s) : Rudolf Schuler et Angelo Schuler.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 35 du 30 août 1985.

(73) Titulaire(s) :

(60) Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

(74) Mandataire(s) : Cabinet Plasseraud.

(54) Produit diététique utile pour diminuer la concentration de l'urée dans les liquides physiologiques et procédé pour sa
préparation.

(57) Produit diététique utile pour diminuer la teneur en urée
des liquides physiologiques et sa préparation.

Le produit contient des bactéries Bifidus du genre Bifido-
bacterium suis ou infantis, contenant elles-mêmes de l'uréase.
On le prépare en cultivant les bactéries dans un milieu nutritif
approprié, de préférence à base de lait ou de lait de soja avec
addition de peptone et/ou d'extrait de levure, et en lyophilisant
la culture obtenue.

FR 2 560 046 - A1

D

Produit diététique utile pour diminuer la concentration de l'urée dans les liquides physiologiques et procédé pour sa préparation.

La présente invention concerne un produit diététique 5 que utile pour diminuer la concentration en urée des liquides physiologiques et un procédé pour sa préparation.

Dans les cas de maladies rénales, de transplantations rénales et dans des cas analogues, le problème se pose d'éliminer l'urée de l'organisme. Normalement, 70% de l'urée 10 formée dans le foie par dégradation des protéines sont excrétés par les reins, et une proportion pouvant aller jusqu'à 30% est également éliminée au travers de la paroi intestinale et détruite par des bactéries ; selon le pH régnant dans l'intestin, il y a fixation dans l'intestin et excréition 15 (aux pH acides) ou bien, en pH alcalin, il y a résorption et transport en retour de l'ammoniac toxique vers le foie. Dans les cas de maladies rénales, il fallait jusqu'à maintenant, pour éliminer l'excès d'urée non évacué par l'intestin, procéder à intervalles réguliers à une dialyse. Si l'on pouvait 20 parvenir à éliminer une plus grande partie de l'urée par l'intermédiaire de l'intestin, on pourrait éventuellement diminuer la fréquence des dialyses ou même les supprimer totalement.

Une condition préalable à cet égard serait que 25 l'urée soit éliminée en continu de l'équilibre qui doit s'établir par l'intermédiaire de la paroi intestinale. Cette condition pourrait être remplie si on produisait dans l'intestin une flore microbienne possédant une forte activité de dégradation de l'urée.

30 Setälæ et collaborateurs de l'Université d'Helsinki ont déjà suggéré que les composés azotés résiduels des liquides physiologiques ne constituaient pas seulement des produits finals du métabolisme, devant être éliminés,

mais, pour une partie d'entre eux, étaient utiles pour une nouvelle synthèse de protéines ou d'aminoacides, de sorte qu'ils ne devaient pas être éliminés complètement ; seul l'excès devrait être éliminé. Pour parvenir à ce but, ils 5 ont déjà proposé de modifier les conditions régnant dans l'intestin de manière à y accroître la dégradation biologique de l'azote résiduel et à provoquer ainsi un déplacement de l'équilibre biologique dans l'intestin. Simultanément, le patient devrait être maintenu à un régime approprié. Dans ces 10 conditions, pour modifier dans le sens voulu les conditions régnant dans l'intestin, on a utilisé des microorganismes du sol, des espèces *Serratia*, *Pseudomonas* et *Rhizobium* ou *Agrobacterium*, sans autre précision, qui contiennent par adaptation des enzymes dégradant l'azote résiduel telles que 15 des uréases, des créatinases et des enzymes analogues, et peuvent donc provoquer une dégradation accrue de l'azote résiduel, par exemple de l'urée, dans l'intestin (*Kidney International*, volume 13, Suppl. 8 (1978), pages 194-202). Toutefois, on a constaté que ces microorganismes n'avaient 20 plus les propriétés voulues dans l'intestin (*Proceeding Eur. Soc for Artificial Organs (ESAO)* volume V, Zürich, 6-8.11.1978). En outre, pour que leurs uréases possèdent une bonne activité, ces microorganismes exigent un pH à peu près neutre. Cependant, dans ces conditions, l'ammoniac formé à la scission de 25 l'urée est à nouveau résorbé et exerce des effets toxiques inacceptables sur le foie. C'est la raison pour laquelle les travaux de *Setelae* n'ont pas conduit aux résultats voulus.

L'invention vise à résoudre ce problème. Elle est basée sur la recherche d'une flore intestinale produisant une 30 uréase ayant une forte activité en pH acide et présentant si possible son activité maximale dans ces conditions. En outre, il doit s'agir d'une uréase formée par constitution et non d'une uréase formée par adaptation en raison de la présence de l'urée.

35 On sait que le bas pH recherché dans l'intestin

pour l'élimination de l'ammoniac peut être provoqué par une flore de *Bifidus*. On a maintenant trouvé qu'il existait certaines souches de *Bifidus* qui, par constitution, forment une uréase à forte activité en pH acide, que cette uréase 5 pouvait scinder en continu l'urée traversant la paroi intestinale et, par conséquent, l'éliminer de l'équilibre.

L'invention a en conséquence pour objet un produit diététique utile pour diminuer la concentration en urée des liquides physiologiques, ce produit se caractérisant en ce 10 qu'il contient des bactéries du type *Bifidus* contenant elles-mêmes de l'uréase, de l'espèce *Bifidobacterium suis* et/ou *Bifidobacterium infantis*.

Les bactéries du type *Bifidus* à utiliser conformément à l'invention, de l'espèce *Bifidobacterium suis*, ont été 15 trouvées chez les porcs. Jusqu'à maintenant, on n'en a pas trouvé chez les humains. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention, la souche *Bifidobacterium suis* DSM 20211. La souche préférée de l'espèce *Bifidobacterium infantis* est la souche DSM 2877. Celle-ci consiste en bâtonnets à gram 20 positif, pléomorphes, anaérobies, qui forment de l'acétate et de l'acide lactique à partir du glucose. La muréine de la paroi cellulaire est du type Orn-Ser-Ala-Thr-Ala. Outre *B. infantis*, *B. longum* et *B. suis* contiennent également ce type 25 de muréine. Ces trois types sont, par le génome, étroitement apparentés. La souche ne peut pas provoquer la fermentation de l'arabinose ni du mélézitose et diffère ainsi de *B.infantis* et *B. longum/B. suis*.

Le produit diététique selon l'invention peut contenir la souche de *Bifidus* contenant de l'uréase du genre 30 *suis* ou *infantis* seule mais de préférence cependant il contient une combinaison avec d'autres souches de *Bifidus*; qui présentent principalement une capacité considérable à former de l'acidité. Parmi ces souches de *Bifidus*, on citera par exemple *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083, 20086, 35 20087 et 20098 ; *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082, 20215

et 20496 ; *Bifidobacterium breve* DSM 20091, 20213 ; *Bifidobacterium catenulatum* DSM 20103 ; *Bifidobacterium infantis* DSM 20088, 20090 et 20223 ; *Bifidobacterium longum* DSM 20097 et 20219 ; *Bifidobacterium sp* DSM 20093.

5 En dehors des souches de *Bifidus* mentionnées, le produit diététique selon l'invention peut encore contenir des additifs usuels tels que des substances aromatisantes, des colorants, des diluants et des substances analogues. De préférence, le produit contient en outre des constituants 10 du milieu de culture, c'est-à-dire des matières solides contenues dans le milieu de culture dans lequel on a produit les bactéries. En particulier donc, le produit diététique contient des constituants lactés ou des matières solides de lait de soja et éventuellement encore de la peptone et/ou de 15 l'extrait de levure.

Le produit diététique selon l'invention peut être mis sous une forme quelconque appropriée à l'administration orale. De préférence, il est à l'état lyophilisé, et il est dispersé avant administration par addition d'un liquide 20 potable tel que l'eau, le lait, le thé ou un liquide analogue jusqu'à consistance appropriée, puis bu. Toutefois, on peut également administrer sous d'autres formes, par exemple dans des capsules de gélatine.

L'invention a également pour objet un procédé 25 préféré pour préparer le produit diététique selon l'invention. Selon ce mode de réalisation préféré, on cultive au moins une souche *Bifidobacterium suis* ou *infantis* et le cas échéant une autre souche de *Bifidobacterium* dans un milieu nutritif approprié et on lyophilise la culture obtenue.

30 Les milieux nutritifs qui conviennent sont toutes les solutions nutritives convenant du point de vue physiologique, diététique et gustatif, de préférence des produits lactés, par exemple le lait de soja qui est préféré, ou bien le petit-lait et plus particulièrement le lait écrémé.

35 On peut introduire dans les milieux nutritifs d'autres

additifs, par exemple l'extrait de levure et/ou des peptones et/ou d'autres substances favorisant la digestion, de préférence en quantité de 1 à 10 g/l par rapport au milieu nutritif fini. En particulier, lorsqu'on utilise du lait écrémé préparé habituellement à partir de poudre de lait écrémé et d'eau, il est recommandé d'ajouter de l'extrait de levure et/ou de la peptone. On peut également utiliser un mélange de deux ou plusieurs des milieux nutritifs appropriés mentionnés ci-dessus. De préférence, on ajoute 0,4 à 0,5% en poids d'extrait de levure et 0,4 à 0,6% en poids de peptone, par rapport au volume de la solution.

Comme on l'a déjà signalé, on peut ajouter au produit diététique selon l'invention d'autres additifs usuels, en particulier des additifs convenant pour les applications diététiques, par exemple du glucose, du bêta-lactose et du lactulose. A l'état lyophilisé, le produit contient de préférence de 10^6 à 10^{10} , plus particulièrement de 10^8 à 10^9 cellules bactériennes vivantes de Bifidum par gramme.

Les microorganismes sont cultivés de la manière connue et habituelle.

La durée de culture dépend de la température. De préférence, on cultive pendant 15 à 30 h à une température de 15 à 45°C et plus particulièrement pendant 24 h à une température de $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Pendant la culture, on maintient de préférence un pH de 5,7 à 5,9, de préférence au moyen d'un alcali. Le lait de chaux (solution d'hydroxyde de calcium) qu'on ajoute en général 2 à 4 fois au cours de la culture, convient tout particulièrement.

Le produit diététique selon l'invention permet de diminuer la quantité d'urée des liquides physiologiques beaucoup plus fortement que par l'élimination intestinale normale. On peut alors, même dans le cas de défaillance rénale, diminuer la teneur en urée au point que les quantités résiduelles soient inoffensives ou puissent être éliminées sans traitement de dialyse ou par un plus petit

nombre de traitements, de sorte qu'on peut prolonger considérablement la période séparant les dialyses individuelles. Naturellement, le malade en ressent un grand soulagement mais en outre, on évite une élimination excessive des 5 composés azotés nécessaires pour les nouvelles synthèses dans l'organisme.

L'exemple qui suit illustre l'invention sans toutefois en limiter son cadre.

Exemple

10 On inocule par une culture pure de *Bifidobacterium infantis* DSM 2877 une solution nutritive préparée à partir de poudre de lait de soja et d'eau, à laquelle on a ajouté, par rapport à la solution nutritive finie, 0,5% en poids d'extrait de levure et 0,5% en poids de peptone. On cultive 15 pendant 24 h à une température de 37°C. A intervalles réguliers d'environ 8 h, on règle le pH à 5,8 - 5,9 par addition de la quantité nécessaire de lait de chaux. On refroidit ensuite la culture et on lyophilise. Le lyophilisat ainsi obtenu est conservé au froid. Pour l'administration, 20 on délaie le produit dans de l'eau tiède (environ 1 cuillère à thé pour 1/4 de litre d'eau) et on boit immédiatement la suspension obtenue.

A la place du lait de soja, on peut utiliser du lait écrémé ou du petit-lait.

REVENDICATIONS

1. Produit diététique utile pour diminuer la concentration en urée des liquides physiologiques, caractérisé en ce qu'il contient des bactéries *Bifidus* contenant 5 une uréase, de l'espèce *Bifidobacterium suis* ou *infantis*.
2. Produit selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il contient *Bifidobacterium suis* DSM 20211 et/ou *Bifidobacterium infantis* DSM 2877.
3. Produit selon la revendication 1 ou 2, 10 caractérisé en ce qu'il contient en outre d'autres espèces *Bifidus*.
4. Produit selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il contient en outre au moins une des souches *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083, 20086, 20087 et 15 20098 ; *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082, 20215 et 20496 ; *Bifidobacterium breve* DSM 20091, 20213 ; *Bifidobacterium catenulatum* DSM 20103 ; *Bifidobacterium infantis* DSM 20088, 20090 et 20223 ; *Bifidobacterium longum* DSM 20097 et 20219 et/ou *Bifidobacterium* sp DSM 20093.
- 20 5. Produit selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il contient en outre des constituants du milieu de culture des souches *Bifidus* contenues.
6. Produit selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il contient en tant que constituants du milieu de 25 culture, des constituants lactés ou des matières solides de lait de soja.
7. Produit selon la revendication 5 ou 6, caractérisé en ce qu'il contient de la peptone et/ou de l'extrait de levure.
- 30 8. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est à l'état lyophilisé.
9. Procédé de préparation du produit diététique selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'on cultive au moins une souche *Bifidobacterium suis* et/ou *infantis* et le cas échéant au moins une autre 35

souche *Bifidobacterium* dans un milieu nutritif approprié et on lyophilise la culture obtenue.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'on utilise en tant que milieu nutritif du lait 5 ou du lait de soja additionné de peptone et/ou d'extrait de levure.

